

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra analytické chemie**

---

OPTIMALIZACE EXPERIMENTÁLNÍCH PODMÍNEK  
MĚŘENÍ PERFLUOROVANÝCH ORGANICKÝCH  
Kyselín METODOU GC

Optimization of experimental conditions for measurements  
of perfluorinated organic acids by GC

Bakalářská práce  
studijního oboru Chemie v přírodních vědách

## Poděkování

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a rámcového programu 14/63 MŠMT a za přispění Norway Grants (Project CZ0116).

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele RNDr. Radomíra Čabaly, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 22. dubna 2010.

## Abstrakt:

Komerční software Pro ezGC byl použit pro výpočet optimálního teplotního programu měření isobutylesterů perfluorovaných organických kyselin ( $C_6$  až  $C_{12}$ ) na plynovém chromatografu s plamenově ionizačním detektorem. Optimalizace byla provedena z hlediska dosažení úplného rozlišení všech píků analytů. Vypočtený teplotní program byl také použit pro měření stejných látek na GC-MS. Vypočtené a naměřené hodnoty byly srovnány, přičemž se ukázalo, že prakticky dosažená rozlišení jsou vyšší než ta vypočtená.

## Klíčová slova:

perfluorované organické kyseliny, isobutylestery, rozlišení píků

## Předmětová hesla:

plynová chromatografie, numerická optimalizace

## Abstract:

Commercial software Pro ezGC was used for calculation of optimal temperature program for analysis of isobutylesters of perfluorinated organic acids ( $C_6$  -  $C_{12}$ ) by gas chromatography with flame ionization detector. Optimization was done with respect to the complete resolution of all peaks of analytes. The calculated temperature program was also applied to the analysis of substances of interest on GC-MS. The calculated and measured values have been compared. The measured resolutions were higher than the calculated ones in all cases.

## Keywords:

perfluorinated organic acids, isobutylesters, peak resolution

## Subject words:

gas chromatography, numerical optimization

## Obsah:

1 Úvod .....	5 -
2 Teoretická část.....	6 -
2.1 Perfluorované organické kyseliny .....	6 -
2.2 Derivatizace perfluorovaných kyselin .....	7 -
2.3 Plynová chromatografie.....	7 -
2.4 Optimalizace podmínek pro chromatografickou analýzu.....	8 -
2.5 Pro ezGC .....	10 -
3 Experimentální část .....	11 -
3.1 Standardy a chemikálie.....	11 -
3.2 Přístrojové vybavení .....	11 -
3.3 Příprava zásobních roztoků .....	12 -
3.3.1 Zásobní roztoky perfluorovaných kyselin v acetonitrilu .....	12 -
3.3.2 Zásobní roztok směsi perfluorovaných kyselin v acetonitrilu.....	12 -
3.4 Derivatizace perfluorovaných kyselin na isobutylestery .....	13 -
3.5 GC analýza .....	13 -
3.5.1 GC-FID .....	13 -
3.5.2 GC-MS .....	14 -
3.6 Optimalizace teplotního programu .....	14 -
3.6.1 Výpočet TRI .....	14 -
3.6.2 Výpočet teplotního programu .....	15 -
4 Výsledky a diskuze.....	16 -
4.1 Výpočet TRI .....	16 -
4.2 Výpočet optimálního teplotního programu.....	17 -
4.2.1 Teplotní program pro zadané minimální rozlišení 1,5 .....	18 -
4.2.2 Teplotní program pro zadané minimální rozlišení 3 .....	20 -
4.3 Použití vypočteného programu na GC-MS .....	22 -
4.3.1 SEI .....	22 -
4.3.2 NCI .....	23 -
5 Shrnutí .....	24 -
6 Seznam zkratk a symbolů .....	25 -
7 Použitá literatura.....	27 -

# 1 Úvod

Tématem mé bakalářské práce je optimalizace experimentálních podmínek měření perfluorovaných organických kyselin pomocí plynového chromatografu s plamenově ionizačním detektorem. K řešení tohoto úkolu byl použit komerční software Pro ezGC.

K optimalizaci měření byly vybrány tyto kyseliny: perfluorohexanová, perfluoroheptanová, perfluoroktanová, perfluorononanová, perfluorodekanová, perfluoroundekanová a perfluorododekanová.

Obecně byly perfluorované sloučeniny v minulosti hodně používány v průmyslu a tak se díky jejich bioakumulativním vlastnostem a odolnosti vůči biodegradaci zařadily mezi významné polutanty životního prostředí. V dnešní době se stále více vědců zabývá jejich toxicitou a nalezením účinné metody pro jejich spolehlivé stanovení v různých složkách životního prostředí.

Cílem práce je (a) nalezení optimálního teplotního programu pro separaci vybraných perfluorovaných organických kyselin s pomocí výpočtu programem Pro ezGC, přičemž kritériem optimalizace je celkové rozlišení píků všech analytů (b) srovnání predikovaných a naměřených dat za podmínek optimálního teplotního programu.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Perfluorované organické kyseliny

Perfluorované organické kyseliny (PFA) jsou perzistentní organické látky, u kterých jsou všechny vodíky v alkylovém řetězci nahrazeny atomy fluoru. Tyto látky přirozeně se nevyskytující v životním prostředí jsou bioakumulativní.

Tabulka č. 1: Fyzikální a chemické vlastnosti vybraných perfluorovaných organických kyselin

Zkratka	Název kyseliny	Molekulový vzorec	Molární hmotnost	Bod varu [°C]
PFHxA	Perfluorohexanová	C <sub>5</sub> F <sub>11</sub> COOH	314,1	157
PFHpA	Perfluoroheptanová	C <sub>6</sub> F <sub>13</sub> COOH	364,1	175
PFOA	Perfluoroktanová	C <sub>7</sub> F <sub>15</sub> COOH	414,1	192
PFNA	Perfluorononanová	C <sub>8</sub> F <sub>17</sub> COOH	464,1	203
PFDA	Perfluorodekanová	C <sub>9</sub> F <sub>19</sub> COOH	514,1	218
PFUnA	Perfluoroundekanová	C <sub>10</sub> F <sub>21</sub> COOH	564,1	237
PFDoA	Perfluorododekanová	C <sub>11</sub> F <sub>23</sub> COOH	614,1	245

Díky svým jedinečným fyzikálním, chemickým a biologickým vlastnostem, které jsou způsobeny velkou elektronegativitou fluoru (vysoce polarizovaná vazba mezi uhlíkem a fluorem je jednou z nejsilnějších kovalentních vazeb), jsou využívány v průmyslové výrobě. Perfluorované sloučeniny jsou více teplotně stálé než jejich analogické uhlovodíky. Téměř všechny organické fluorované sloučeniny jsou odolné vůči hydrolýze, fotolýze, biodegradaci a procesům v metabolismu [1, 2].

Největší počet studií perfluorovaných látek je zaměřen na perfluoroktansulfonát (PFOS) a kyselinu perfluoroktanovou (PFOA). Tyto dvě perfluorované látky jsou nejvíce zastoupeny v životním prostředí a proto se sleduje jejich množství v biologických materiálech, půdě, vodě a vzduchu [3, 4].

PFOA se používá jako pomocné činidlo při výrobě polytetrafluorethylenu (PTFE) známého jako Teflon nebo Gore-tex [5].

Deriváty perfluorovaných kyselin mají rozsáhlé využití jako takzvané

supersurfactants. Tyto látky jsou schopné modifikovat vlastnosti povrchů materiálů a poskytovat jim odolnost proti špíně, olejovitým látkám a vodě. Tento mechanismus působení je založen na tom, že při ošetření povrchu perfluorovanými látkami se perfluorovaný uhlíkový řetězec orientuje směrem ven z povrchu, čímž snižuje povrchové napětí, a vytváří tak ochranou bariéru. Jsou proto používány na ochranu koberců, textilií, oděvů, nábytku, čalounění a výrobků z kůže proti znečištění [6].

## 2.2 Derivatizace perfluorovaných kyselin

Perfluorované kyseliny jsou málo těkavé a poměrně kyselé látky, což znesnadňuje jejich přímou analýzu metodou plynové chromatografie. Proto je vhodné převést tyto polární látky na těkavější a méně polární látky derivatizací.

Bylo publikováno několik způsobu derivatizace, nejčastěji na methylestery. Jedna z používaných metod je methylace methanolem za katalýzy kyselinou sírovou [7] nebo převedení perfluorovaných kyselin ( $C_7 - C_{10}$ ) na methylestery účinkem methanolu a  $BF_3$  s následným použitím headspace SPME [8].

Derivatizace perfluorovaných kyselin na estery lze rovněž provádět reakcí s chlormravenčany. Je možné takto derivatizovat různé druhy kyselin (např. aminokyseliny, mastné kyseliny, oxokyseliny) na estery podle druhu použitého chlormravenčanu. Uhlovodíkový zbytek chlormravenčanu se váže na kyselinu za vzniku daného esteru. Do reakce dále vstupuje pyridin a příslušný alkohol, které slouží jako pomocné látky [9 – 11].

## 2.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je analytická metoda, která umožňuje identifikaci a stanovení nejen plynů, ale i všech látek, které lze definovaným způsobem převést na páry. Je definována jako fyzikálně-chemická metoda separace látek ze směsi na základě distribuce mezi dvě heterogenní fáze (stacionární, realizovanou sorpčně aktivní látkou, a mobilní fází – nosným plynem). Jde o jednoduchou, citlivou metodu s vysokou separační účinností a rozsáhlými aplikačními možnostmi. Díky těmto vlastnostem lze této metody využít při stanovení perfluorovaných látek ve složkách životního prostředí.

Metodou plynové chromatografie lze látky kvalitativně charakterizovat těmito retenčními charakteristikami:

$t_M$  – mrtvý retenční čas, který odpovídá době, jakou analyt stráví v mobilní fázi

$t_R$  – retenční čas je celková doba, kterou analyt stráví v koloně

$t_R'$  – redukovaný retenční čas odpovídá průměrné době, kterou stráví analyt ve stacionární fázi

$$t_R' = t_R - t_M \quad (1)$$

$k$  – retenční faktor je poměr času, který stráví molekuly analytu ve stacionární fázi a času, který stráví v mobilní fázi, používá se pro obecné vyjádření retence a nezávisí na rozměrech kolony [12].

$$k = t_R' / t_M \quad (2)$$

## 2.4 Optimalizace podmínek pro chromatografickou analýzu

Optimalizaci chromatografického procesu lze v nejširším smyslu chápat jako racionální volbu pracovních podmínek, aby bylo co nejefektivněji dosaženo požadovaného cíle separace. Mezi nejdůležitější hlediska separace patří: rozlišení, rychlost separace a množství separovaných látek. Většinou lze zlepšit jedno na úkor ostatních.

K optimalizaci se používá nastavení řady experimentálních parametrů: druh stacionární fáze, rozměry kolony, velikost částic náplně, druh mobilní fáze, průtok mobilní fáze, způsob detekce, typ a citlivost detektoru, pracovní teploty, teplotní programy, průtokové programy. Optimalizuje se buď jeden experimentální parametr, nebo několik parametrů postupně nezávisle na sobě, a nebo současně několik parametrů [13].

Při optimalizaci více experimentálních parametrů současně se využívá matematických vztahů a statistických postupů [14].



V plynové chromatografii hraje optimalizace teplotního programu důležitou roli. Při separaci látek s velmi rozdílnými teplotami varu zkracuje celkovou dobu analýzy na potřebné minimum.

Kritéria separace se dají rozdělit do dvou skupin: ty, které charakterizují separaci jedné dvojice látek (např. rozlišení), a ty, které charakterizují jedinou hodnotou úroveň separace všech složek vzorku (např. relativní produkt rozlišení).

Rozlišení dvou píků:

$$R_{j,k} = 2 \cdot \frac{t_{R_k} - t_{R_j}}{w_j + w_k} \quad (3)$$

kde  $t_R$  jsou retenční časy [min] a  $w$  šířky píků při základně [min], případně

$$R_{j,k} = 1,18 \cdot \frac{t_{R_k} - t_{R_j}}{w'_j + w'_k} \quad (4)$$

kde  $w'$  jsou šířky píků v polovině výšky [min]. Minimální hodnota rozlišení nutná pro kvantitativní analýzu je 1,5.

Relativní produkt rozlišení:

$$r = \prod_{i=1}^{n-1} R_{j,k} / \left[ \sum_{i=1}^{n-1} R_{j,k} / (n-1) \right]^{(n-1)} \quad (5)$$

kde  $R_{j,k}$  je rozlišení pro jednotlivé dvojice látek se sousedními píky a  $n$  celkový počet píků na chromatogramu. Může nabývat hodnot od nuly, pro kompletně překrývající se dva píky, až po maximální hodnotu, kdy jsou všechny hodnoty rozlišení stejné [15, 16].

Relativní směrodatná odchylka (v %):

$$s_r = \frac{k_n \cdot R_x}{\tilde{x}} \cdot 100 \quad (6)$$

kde  $k_n$  je Dean-Dixonův koeficient (zde 0,591),  $R_x$  rozpětí a  $\tilde{x}$  medián.

## 2.5 Pro ezGC

Pro ezGC<sup>®</sup> firmy Analytical Innovations, Inc. (Kettering, OH, USA) je softwarový program pro optimalizaci experimentálních podmínek měření na plynovém chromatografu. Mezi jeho nejpoužívanější funkce patří výpočet optimálního teplotního programu pro zadanou skupinu látek ve vzorku.

Teorie výpočtu optimálního teplotního programu pomocí termodynamických retenčních indexů byla objasněna v několika vědeckých studiích [17, 18]. Dose [19] uvádí, že izotermální retence analytu  $i$  v kapilární koloně o určitém fázovém poměru se řídí vztahem:

$$\ln k_i = \frac{\Delta H_{v,i}}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln \left( \frac{\Delta S_{v,i}}{\beta \cdot R} \right) \quad (7)$$

kde  $R$  je molární plynová konstanta [ $8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ],  $T$  termodynamická teplota kolony [K],  $k_i$  retenční faktor analytu  $i$  mezi stacionární a mobilní fází,  $\beta$  fázový poměr kolony a  $\Delta S_{v,i}$  a  $\Delta H_{v,i}$  jsou změny molární výparné entropie (dále jen entropie) [ $\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ] a molární výparné entalpie (dále jen entalpie) [ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ] analytu  $i$  při přechodu analytu ze stacionární fáze do nosné plynné fáze. Tato rovnost definuje matematický vztah mezi teplotou a chováním směsi popsany retenčním faktorem  $k$ . Takto lze spočítat  $\Delta H$  a  $\Delta S$ , když známe teplotu a retenční faktor  $k$ . Ten lze vyjádřit z retenčního času při určité teplotě. Pro dva neznámé parametry, je tedy nutné provést dvě analýzy s různými teplotními programy. Teplotní programy musí začínat na stejné počáteční teplotě (je-li počáteční teplota určitou dobu izotermální, tak musí být v obou programech stejně dlouhá), teplotní gradienty programů se mezi sebou musí lišit v násobku dvou až čtyř a koncová teplota programu s menším gradientem musí být alespoň o  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  nižší, než programu s vyšším gradientem. Přímký teplotních programů se tedy nesmí navzájem protínat. Z retenčních časů při dvou různých teplotních programech program spočítá termodynamické retenční indexy (TRI): entalpii  $\Delta H$  a entropii  $\Delta S$  (označení TRI používané programem není blíže specifikované). TRI závisí pouze na vzorku a typu stacionární fáze. Známe-li tedy  $k_i$ ,  $\Delta H$  a  $\Delta S$ , retenční čas analytu na určité stacionární fázi může být spočítán při libovolném teplotním programu, průtokové rychlosti mobilní fáze nebo rozměrech kolony [20 – 22].

## 3 Experimentální část

### 3.1 Standardy a chemikálie

Byly použity tyto standardy: perfluorohexanová kyselina (< 95 %, Fluka, Lancaster), perfluoroheptanová kyselina (< 95 %), perfluoroktanová kyselina (< 95 %), perfluorononanová kyselina (97 %), perfluorodekanová kyselina (98 %), perfluoroundekanová kyselina (95 %), perfluorododekanová kyselina (95 %, všechny Sigma.Aldrich, St. Luis, USA).

Použitými chemikáliemi byl hexan (99 % Baker Analyzed, Mallinckrodt Baker B.V., Regente, Holandsko), isobutylalkohol (p.a., Lach.-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika), acetonitril (p.a., Lichrosolv, Merck, Darmstadt, Německo), pyridin (99 %) a chlormravenčan methylnatý (98 %, oba Aldrich, Steinheim, Německo).

### 3.2 Přístrojové vybavení

Většinu analýz jsem provedl na plynovém chromatografu GCMS-2010 s plamenově ionizačním detektorem (FID) (Shimadzu, Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko). Nosným plynem byl dusík (5.0 Linde Technoplyn). Všechna měření byla uskutečněna na středně polární koloně Rtx-200MS (Restek, USA) délky 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 µm. Sběr dat a zpracování výsledků bylo provedeno v LabSolution (GC solution 2.30, Shimadzu).

Dále bylo měřeno na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem GCMS-QP2010 plus, (Shimadzu, Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko) se stejnou kolonou. Nosným plynem bylo helium (5.0 Linde Technoplyn). K dispozici byl hmotnostní detektor s SEI a NCI ionizací.

SEI (semi-electron ionization) probíhající v komoře určené pro NCI (negative chemical ionization) pracuje na stejném principu jako EI (electron ionization, ionizace nárazem elektronů), ale liší se od ní nižší účinností. NCI (negative chemical ionization) je šetrnější ionizační technika, kdy se energie zrychlených elektronů přenáší na analyt pomocí reakčního média (v tomto případě methanu). Obsahuje-li analyt atomy s velkou elektronovou afinitou (např. halogeny), dochází ke značnému nárůstu detekční citlivosti.

Ke sběru dat a zpracování výsledků byl použit program LabSolution (GCMS solution 2.53, Shimadzu).

Při derivatizaci byly vzorky vytřepávány na třepačce (Vortexgenie 2, Scientific Industrie, Hampshire, Velká Británie) a promíchávány v ultrazvukové lázni (Sonorex RK 100, Bandelin, Barlen, Německo).

K pipetování vzorků sloužily automatické pipety 1-10 µl (Biohit, Helsinky, Finsko) a 50-250 µl (Eppendorf, Hamburg, Německo).

K dávkování do plynového chromatografu byl použit autosampler AOC-20i (Shimadzu, Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko) s plynotěsnou stříkačkou o objemu 10 µl (Hamilton, Reno, USA).

Pro výpočet teplotního optima byl použit program Pro ezGC (Analytical Innovations, Inc., Kettering, OH, USA, ver. 2.20)

### 3.3 Příprava zásobních roztoků

#### 3.3.1 Zásobní roztoky perfluorovaných kyselin v acetonitrilu

Byly připraveny zásobní roztoky 7 perfluorovaných kyselin. Kyseliny pefluorhexanové (PFHxA), kyseliny pefluorheptanové (PFHpA), kyseliny perfluoroktanové (PFOA), kyseliny perfluornonanové (PFNA) kyseliny perfluordekanové (PFDA), kyseliny perfluorundekanové (PFUnA) a kyseliny perfluordodekanové (PFDaA). Bylo naváženo asi 50 mg přesně jednotlivých kyselin, které byly kvantitativně převedeny do polypropylenových odměrek a doplněny do 5 ml acetonitrilem. Tak byly získány zásobní roztoky o koncentracích PFHxA 10,12 mg/ml, PFHpA 10,12 mg/ml, PFOA 10,12 mg/ml, PFNA 10,00 mg/ml, PFDA 10,01 mg/ml, PFUnA 10,04 mg/ml a PFDaA 10,05 mg/ml.

#### 3.3.2 Zásobní roztok směsi perfluorovaných kyselin v acetonitrilu

Byl připraven zásobní roztok směsi 7 perfluorovaných kyselin. Do polypropylenové vialky bylo postupně odpipetováno 100 µl z každého roztoku kyselin a přidáno 300 µl

acetonitrilu. Výsledné koncentrace kyselin tedy byly: PFHxA 1,01 mg/ml, PFHpA 1,01 mg/ml, PFOA 1,02 mg/ml, PFNA 1,00 mg/ml, PFDA 1,00 mg/ml, PFUnA 1,00 mg/ml a PFDoA 1,01 mg/ml.

### 3.4 Derivatizace perfluorovaných kyselin na isobutylestery

Derivatizace perfluorovaných kyselin byla provedena v polypropylenových mikrozkuvkách Eppendorf o objemu 0,5 ml. Reakční médium bylo připraveno o tomto složení: 20  $\mu$ l roztoku směsi perfluorovaných kyselin v acetonitrilu (viz. 3.3.2), 158  $\mu$ l acetonitrilu, 8  $\mu$ l isobutylalkoholu, 4  $\mu$ l pyridinu a 10  $\mu$ l chlormravenčanu methylnatého. Směs byla míchána 20 s v ultrazvukové lázni a poté nechána v klidu po dobu 8 minut. S přidavkem 200  $\mu$ l hexanu byla celá směs 1 minutu třepána na třepáčce a následně byla ke GC analýze odebrána horní hexanová fáze do čisté polypropylenové mikrovialky[11].

### 3.5 GC analýza

#### 3.5.1 GC-FID

Na plynovém chromatografu GCMS-2010 s plamenově ionizačním detektorem (FID) bylo hledáno teplotní optimum pro měření isobutylestrů perfluorovaných kyselin. Měření bylo provedeno za těchto podmínek: teplota detektoru 300 °C, teplota injektoru 280 °C, lineární průtoková rychlost 40 cm/sec. Počáteční pracovní tlak nosného plynu byl 60 kPa. U plamenově ionizačního detektoru byla průtoková rychlost vzduchu 400 ml/min, vodíku 40 ml/min a make-up dusíku 30 ml/min. Split poměr nastaven na 1:50.

### 3.5.2 GC-MS

Na plynovém chromatografu GCMS-QP2010 plus s hmotnostním detektorem byla použita metoda pro měření isobutylesterů perfluorovaných kyselin vyvinutá na GC s FID. Měření bylo provedeno za těchto podmínek: teplota detektoru 300 °C, teplota injektoru 250 °C, lineární průtoková rychlost 40 cm/s. Počáteční pracovní tlak nosného plynu byl 54,1 kPa. Split poměr nastaven na 1:50. Měření bylo provedeno v SCAN módu. Byla použita ionizační komora NCI, která umožňuje i použití SEI. Při použití SEI byl nalezen interval cut-off času hexanu pro vypnutí MS detektoru dávkováním par hexanu o objemu 1 µl.

## 3.6 Optimalizace teplotního programu

### 3.6.1 Výpočet TRI

Pro výpočet optimálního teplotního programu isobutylesterů perfluorovaných kyselin byl použit softwarový program Pro ezGC. Protože perfluorované organické kyseliny nebyly v databázi látek, bylo nutné je do ní přidat. Byly vypočítány termodynamické retenční indexy (TRI) všech látek v dané oblasti chromatogramu pomocí jejich retenčních časů ze dvou rozdílných teplotních programů. Pro výpočet hodnot TRI byly zvoleny tyto dva teplotní programy (tabulka č. 2):

Tabulka č. 2: Teplotní programy pro výpočet TRI

Program č.	Počáteční teplota [°C]	Teplotní gradient [°C/min]	Konečná teplota [°C]
1	60	5	250
3	60	15	255

Po zadání teplotních programů spolu s retenčními časy bylo třeba zadat informace o koloně, průtoku mobilní fáze, injektoru a detektoru. Dále hodnotu vstupního a výstupního tlaku v koloně a počáteční teplotu pece chromatografu.

Pro zjištění závislosti vypočtených hodnot TRI na zvolených teplotních programech

byly vybrány další kombinace programů. Nutnou podmínkou bylo, aby se jejich teplotní gradienty lišily násobkem dvou až čtyř. Pro výpočet TRI byly zvoleny programy s teplotními gradienty lišící se násobkem tří (tabulka č. 2). Další programy byly zvoleny s teplotními gradienty lišící se násobkem dvou (tabulka č. 3) a čtyř (tabulka č. 4).

Tabulka č. 3: Teplotní programy s gradienty lišící se násobkem dvou

Program č.	Počáteční teplota [°C]	Teplotní gradient [°C/min]	Konečná teplota [°C]
1	60	5	250
2	60	10	255

Tabulka č. 4: Teplotní programy s gradienty lišící se násobkem čtyř

Program č.	Počáteční teplota [°C]	Teplotní gradient [°C/min]	Konečná teplota [°C]
1	60	5	250
4	60	20	255

### 3.6.2 Výpočet teplotního programu

Pro samotný výpočet optimálního teplotního programu bylo nutno nastavit parametry plynového chromatografu, jako rozměry kolony, plyn mobilní fáze, teplotu pece, průtok mobilní fáze, vstupní a výstupní tlak na koloně, rozsah teplot, ve kterých má být teplotní program, a minimální rozlišení dvou sousedních píků. Bylo zvoleno: mobilní fáze – vodík, vstupní tlak – 60 kPa, výstupní tlak – 99 kPa, detektor – FID, teplota pece – 60 °C, konstantní průtoková rychlost – 40 cm/s, minimální rozlišení sousedních píků – 1,5 a poté 3. Při výběru rozsahu teplot teplotního programu bylo vybráno: počáteční teplota – mezi 50 °C a 80 °C v kroku po 5 °C, délka počáteční teploty – mezi 0 min a 5 min v kroku po 1 min, teplotní gradient – mezi 5 °C/min a 30 °C/min v kroku po 1 °C/min, konečná teplota – mezi 150 °C a 200 °C v kroku po 10 °C.

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Výpočet TRI

Nejprve byly změřeny retenční časy látek pro čtyři teplotní programy (tabulka č. 5). Pro výpočet TRI byly použity data z teplotních programů 1 a 3. Kombinace 1 – 2 a 1 – 4 byly použity na porovnání výsledků v závislosti na výběru gradientu teploty.

Tabulka č. 5: Retenční časy látek čtyř rozdílných teplotních programů

		$t_{R1}$ (5 °C/min)	$t_{R2}$ (10 °C/min)	$t_{R3}$ (15 °C/min)	$t_{R4}$ (20 °C/min)
	látka	[min]	[min]	[min]	[min]
1	–	5,04	5,04	5,04	5,05
2	PFHxA	5,63	5,59	5,56	5,54
3	PFHpA	7,65	7,21	6,93	6,75
4	–	8,95	8,13	7,67	7,37
5	PFOA	9,73	8,61	8,03	7,66
6	–	10,26	8,97	8,31	7,90
7	–	11,26	9,60	8,79	8,23
8	PFNA	11,75	9,84	8,94	8,40
9	PFDA	13,64	10,91	9,71	9,02
10	PFUnA	15,42	11,88	10,39	9,55
11	PFDxA	17,09	12,76	11,00	10,02

TRI spočítané pomocí programu Pro ezGC jsou uvedeny v tabulce č. 6. Zde je vidět, že TRI se nejvíce liší v případě prvního píku. Je to způsobeno velkým rozdílem mezi hodnotami naměřenými a vypočtenými programem. Všechny ostatní kombinace programů neudávaly tak velký rozdíl mezi hodnotami jako právě tato. Na pozdější výpočet teplotního programu neměly tyto hodnoty žádný vliv.

Z hodnot TRI získaných z teplotních programů 1 a 3 byla vytvořena nová databáze látek pro výpočet teplotního programu.



Tabulka č. 6: Termodynamické retenční indexy

látky	$\Delta S$ [J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup> ]				$\Delta H$ [kJ·mol <sup>-1</sup> ]			
	Kombinace programů			$s_r$	Kombinace programů			$s_r$
	1 – 3	1 – 4	1 – 2	[%]	1 – 3	1 – 4	1 – 2	[%]
1 –	37,67	48,13	52,73	19,7	30,97	34,32	35,99	8,6
2 PFHxA	197,95	197,11	197,11	0,3	84,54	84,54	84,54	0,0
3 PFHpA	105,04	105,04	105,04	0,0	55,24	55,24	55,24	0,0
4 –	89,14	89,56	85,79	2,5	50,64	51,06	49,80	1,5
5 PFOA	96,67	97,51	97,09	0,5	53,99	53,99	53,99	0,0
6 –	89,14	88,72	87,05	1,4	51,48	51,48	51,06	0,5
7 –	83,28	82,44	81,19	1,5	50,22	50,22	49,80	0,5
8 PFNA	94,58	94,16	92,07	1,6	54,41	54,41	53,57	0,9
9 PFDA	94,58	94,16	93,33	0,8	56,08	55,66	55,24	0,9
10 PFUnA	96,67	95,00	94,58	1,3	58,17	57,33	57,33	0,9
11 PFDoA	97,93	97,09	97,93	0,5	59,85	59,43	59,85	0,4

## 4.2 Výpočet optimálního teplotního programu

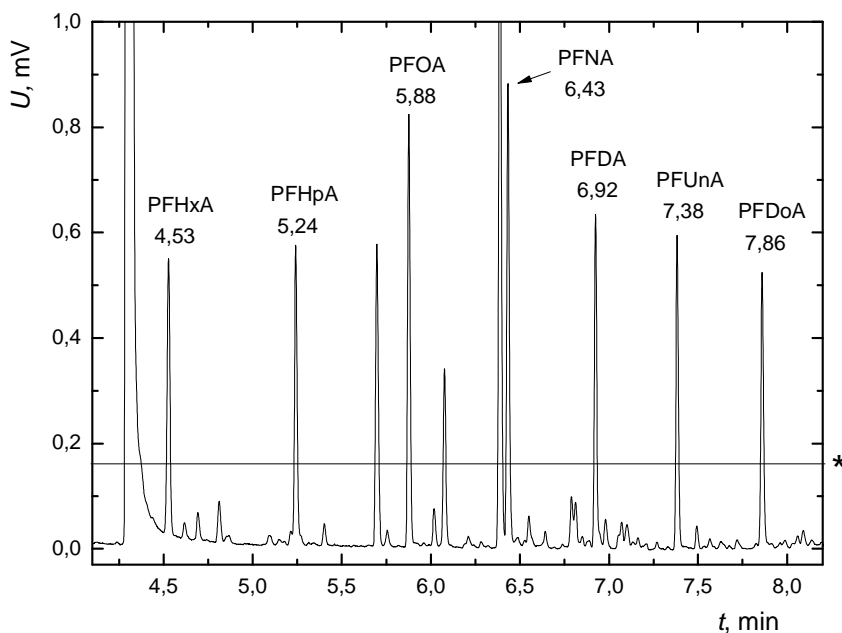
Po vybrání látek z nové databáze byly nastaveny parametry chromatografu a zadány podmínky pro výpočet teplotního programu. Nejdříve bylo nastaveno minimální rozlišení 1,5 a poté 3. Program pro každé zvolené rozlišení vypočítal 50 teplotních programů lišících se počátečními teplotami, teplotními gradienty i konečnými teplotami. Dále zobrazil informace o celkové době trvání programu, vypočítal retenční časy látek a jejich rozlišení.

### 4.2.1 Teplotní program pro zadané minimální rozlišení 1,5

Z 50 teplotních programů byl vybrán ten, u kterého byla spočítána nejvyšší hodnota  $r$  pro všechny píky. V tomto případě to byl teplotní program č. 48, u kterého bylo minimální vypočtené rozlišení 2,3.

Navržený optimální teplotní program vypadal takto: počáteční teplota 60 °C po dobu 3 minut, poté teplotní gradient 22 °C/min až do teploty 150 °C a poté ještě izotermicky 2 min.

Chromatogram isobutylesterů kyselin podle teplotního programu č. 48 zobrazuje obrázek č. 1. Porovnání hodnot rozlišení a retenčních časů vypočtených programem a změřených na GC-FID je uvedeno v tabulce č. 7.



Obrázek č. 1: Chromatogram směsného vzorku perfluorovaných kyselin (všechny po 1,0 mg/ml) derivatizovaných na isobutylestery změřený na GC-FID s teplotním programem č. 48. Píky pod čarou označenou \* nebyly integrovány.

Podmínky integrace píků byly nastaveny takovým způsobem, aby byly integrovány pouze majoritní píky. Pouze tyto píky byly dále zahrnuty do výpočtů.

Tabulka č. 7: Porovnání vypočtených a změřených retenčních časů a hodnot rozlišení teplotního programu č. 48

	látko	Vypočteno		Změřeno	
		$t_R$ [min]	$R$	$t_R$ [min]	$R$
1	–	4,24	–	4,30	–
2	PFHxA	4,36	4,8	4,53	7,0
3	PFHpA	5,18	20,7	5,24	24,6
4	–	5,66	8,0	5,70	16,3
5	PFOA	5,84	8,0	5,88	6,6
6	–	6,04	8,9	6,08	7,3
7	–	6,36	2,3	6,39	11,5
8	PFNA	6,41	2,3	6,43	1,8
9	PFDA	6,91	20,4	6,92	3,0
10	PFUnA	7,36	20,3	7,38	18,1
11	PFDoA	7,82	20,3	7,86	17,5
		$r = 0,06$		$r = 0,07$	

Z tabulky je patrné, že program poměrně přesně počítá retenční časy látek, ale už hůře hodnoty rozlišení. To je způsobeno tím, že program nepočítá s proměnnou šířkou píků při základně různých látek, ale počítá vždy se stejnou. Toto lze upravit v další funkci programu, která ale nebyla v této práci použita.

Nejnižší hodnota rozlišení vypočtená programem byla 2,3 a nejnižší hodnota naměřená 1,8. To znamená, že i po nastavení minimální hodnoty je experimentální hodnota vyšší, a proto zde nemá rozdílná šířka píků vliv.

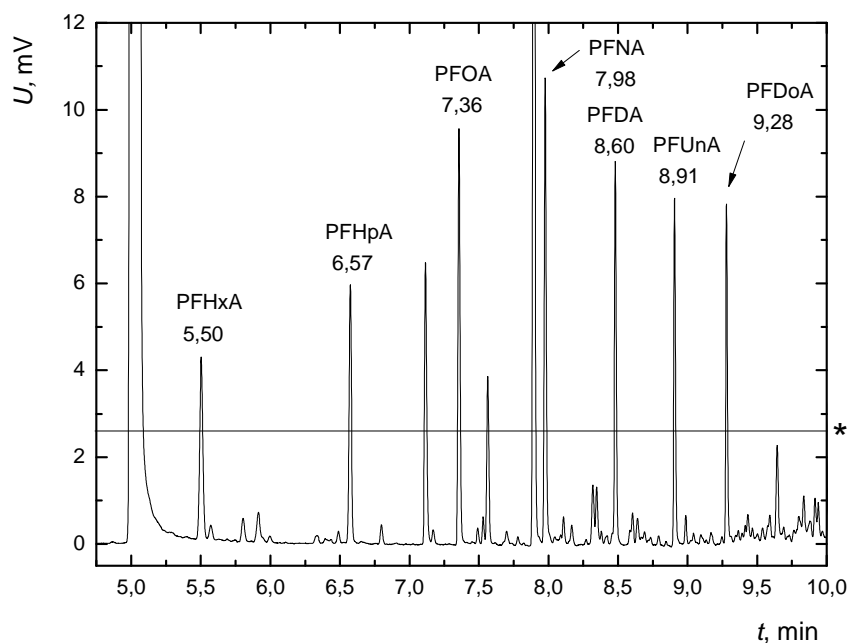
Relativní produkt rozlišení se liší vypočtenými a změřenými hodnotami o 15 %.

## 4.2.2 Teplotní program pro zadané minimální rozlišení 3

Tak jako v předchozím případě byl z teplotních programů vybrán ten, u kterého byla spočítána nejvyšší hodnota  $r$ . V tomto případě to byl teplotní program č. 23, u kterého bylo minimální vypočtené rozlišení 3,4.

Navržený optimální teplotní program vypadal takto: počáteční teplota 60 °C po dobu 5 minut, poté teplotní gradient 26 °C/min až do teploty 200 °C.

Chromatogram isobutylesterů kyselin podle teplotního programu č. 23 zobrazuje obrázek č. 2. Porovnání hodnot rozlišení a retenčních časů vypočtených programem a změřených na GC-FID je uvedeno v tabulce č. 8.



Obrázek č. 2: Chromatogram směsného vzorku perfluorovaných kyselin (všechny po 1,0 mg/ml) derivatizovaných na isobutylestery změřený na GC-FID s teplotním programem č. 23. Píky pod čarou označenou \* nebyly integrovány.

Tabulka č. 8: Porovnání vypočítaných a změřených retenčních časů a hodnot rozlišení teplotního programu č. 23

	látko	Vypočteno		Změřeno	
		$t_R$ [min]	$R$	$t_R$ [min]	$R$
1	–	5,05	–	5,04	–
2	PFHxA	5,54	8,3	5,50	9,7
3	PFHpA	6,58	21,3	6,57	17,4
4	–	7,12	9,9	7,12	17,8
5	PFOA	7,36	9,2	7,36	8,6
6	–	7,56	9,2	7,56	7,5
7	–	7,90	3,4	7,89	12,1
8	PFNA	7,97	3,4	7,98	3,1
9	PFDA	8,48	20,3	8,60	4,4
10	PFUnA	8,90	18,1	8,91	11,4
11	PFDoA	9,27	18,1	9,28	16,3
		$r = 0,17$		$r = 0,27$	

V tomto případě se zvýšila přesnost výpočtu retenčních časů, ale hodnoty rozlišení jsou opět velmi odlišné.

U tohoto teplotního programu se sice téměř o 400 % zvětšil relativní produkt rozlišení ve srovnání s předchozím teplotním programem, ale celková doba analýzy se prodloužila o 15 %. Dále se zvýšila koncová teplota ze 150 °C na 200 °C, což zvyšuje dobu nutnou pro chlazení kolony mezi jednotlivými měřeními. Nejnižší naměřená hodnota rozlišení zde byla 3,1, což opět potvrzuje vyšší hodnotu, než nastavenou hodnotu minimální. Pro kvantitativní analýzu je takto vysoká hodnota rozlišení zbytečná, nastavení minimálního rozlišení na takto vysokou hodnotu bylo provedeno pouze ze zkušebních důvodů. Proto byl vybrán jako výsledný teplotní program č. 48.

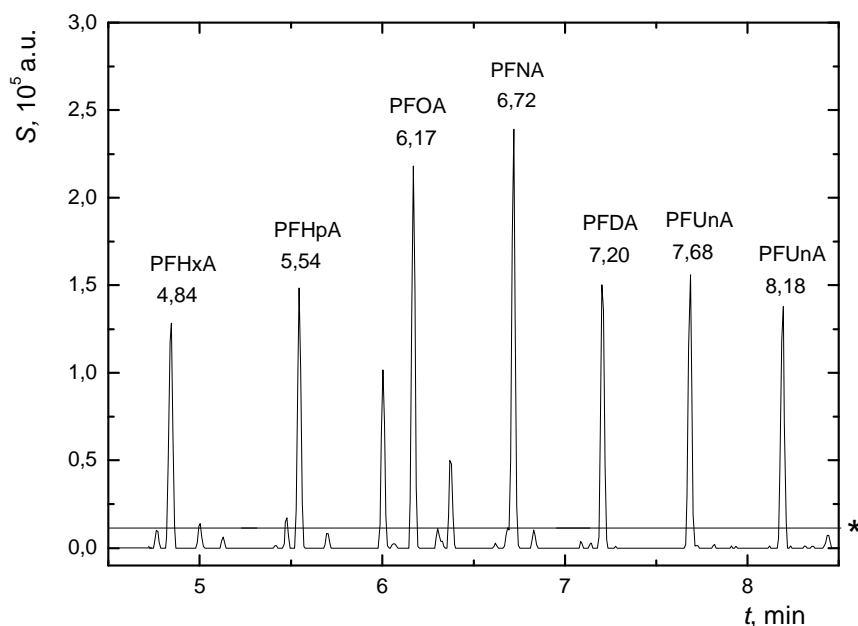
Relativní produkt rozlišení se liší vypočtenými a změřenými hodnotami o 37%.

## 4.3 Použití vypočteného programu na GC-MS

Po instalaci kolony a výměně ionizačního zdroje, který umožňuje výběr mezi SEI a NCI ionizací, byl použit pro analýzu kyselin teplotní program č. 48. Zde nebyly srovnávány hodnoty rozlišení ani retenčních časů s vypočtenými hodnotami, protože se změnila mobilní fáze a výstupní tlak kolony.

### 4.3.1 SEI

Nejdříve byl proměřen čistý hexan pro ověření funkčnosti a nastavení cut-off času pro MS detektor. Poté byl zadán teplotní program č. 48 a proměřen směsný vzorek perfluorovaných kyselin derivatizovaných na isobutylestery (obrázek č. 3).



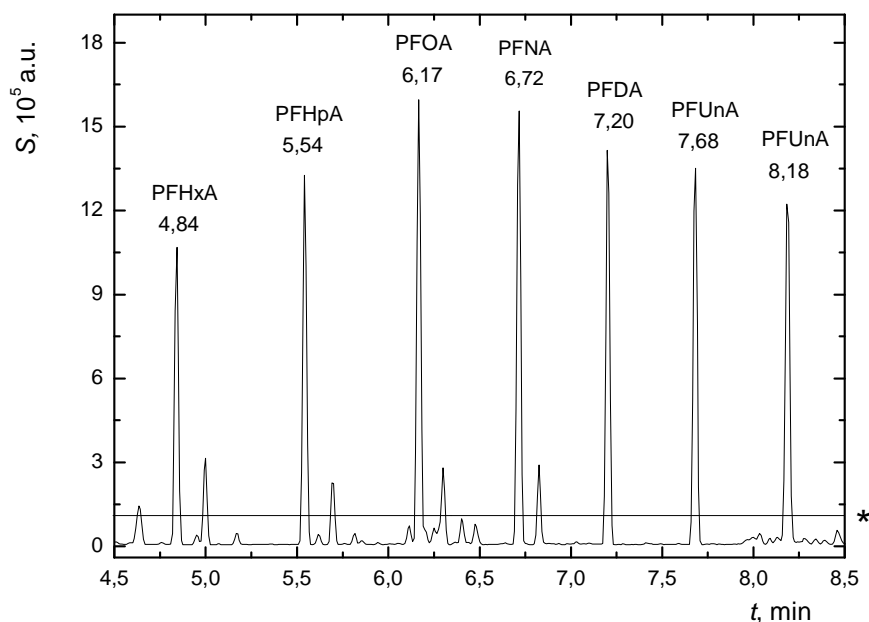
Obrázek č. 3: Chromatogram směsného vzorku perfluorovaných kyselin (všechny po 1,0 mg/ml) derivatizovaných na isobutylestery změřeny na GC-MS s ionizačním zdrojem SEI. Píky pod čarou označenou \* nebyly integrovány.

Nejnižší naměřená hodnota rozlišení zde byla 1,9 a hodnota relativního produktu rozlišení 1,03. Do databáze hmotnostních spekter programu LabSolution byly přidány hmotnostní spektra isobutylesterů perfluorovaných kyselin ( $C_6 - C_{12}$ ).

### 4.3.2 NCI

Nejprve byl optimalizován vstupní tlak methanu, aby bylo dosaženo nejvyšší ionizace vzorku a jeho optimální hodnota činila 2,6 bar. Poté byl změřen směsný vzorek kyselin po jejich derivatizaci.

Ve srovnání s SEI ionizací bylo možné pozorovat několikanásobně vyšší citlivost detekce, protože negativní chemická ionizace je velmi citlivá na atomy s vysokou elektronegativitou. V našem případě jsou to atomy fluoru na uhlíkovém řetězci kyseliny.



Obrázek č.4: Chromatogram směsného vzorku perfluorovaných kyselin (všechny po 1,0 mg/ml) derivatizovaných na isobutylestery změřený na GC-MS s ionizačním zdrojem NCI. Píky pod čarou označenou \* nebyly integrovány.

Nejnižší hodnota rozlišení zde byla 3,0 a hodnota relativního produktu rozlišení 0,52.

Závěrem lze konstatovat, že naměřené hodnoty relativního produktu rozlišení a minimální hodnoty rozlišení kritického páru pík jsou ve všech případech lepší než hodnoty vypočtené softwarem. Program Pro ezGC se tudíž ukázal jako vhodný pro výpočet a návrh optimálního teplotního programu v GC analýzách.

## 5 Shrnutí

Byly vypočteny hodnoty změny molární výparné entropie a entalpie pro 7 isobutylesterů perfluorovaných organických kyselin. Relativní směrodatné odchylky pro změnu molární entropie jsou do 2,5 % a do 1,5 % pro změnu molární entalpie.

Byl vypočítán optimální teplotní program pro měření směsi perfluorovaných organických kyselin ( $C_6 - C_{12}$ ) metodou GC-FID, který pro zadané minimální rozlišení 1,5 vypadá takto: počáteční teplota 60 °C po dobu 3 minut, poté teplotní gradient 22 °C/min až do teploty 150 °C a poté ještě izotermicky 2 minuty. Minimální změřené rozlišení zde bylo 1,8 a relativní produkt rozlišení pak 0,07.

Pro stejné látky měřené stejnou metodou byl vypočítán optimální teplotní program pro zadané minimální rozlišení 3, který vypadá takto: počáteční teplota 60 °C po dobu 5 minut, poté teplotní gradient 26 °C/min až do teploty 200 °C. Minimální změřené rozlišení zde bylo 3,1 a relativní produkt rozlišení pak 0,27.

Vypočtený optimální teplotní program byl použit pro stejné látky měřené metodou GC-MS a to jak pomocí ionizace nárazem elektronů (SEI), tak i chemické ionizace (NCI). Minimální změřené rozlišení zde bylo 1,9 pro SEI a 3,0 pro NCI. Relativní produkt rozlišení pak 1,03 pro SEI a 0,52 pro NCI.

Program Pro ezGC se osvědčil jako pomocník při plánování a provádění GC analýz.



## 6 Seznam zkratek a symbolů

a.u. - arbitrární jednotka signálu (Arbitrary unit)

GC-FID - plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem

GC-MS - plynová chromatografie s hmotnostním detektorem

$k$  - retenční faktor

$k_n$  - Dean-Dixonův koeficient

min - minuta

$n$  - celkový počet píků na chromatogramu

NCI - negativní chemická ionizace

PFA - perfluorovaná kyselina

PFDA - perfluordekanová kyselina

PFDoA - perfluordodekanová kyselina

PFHpA - perfluorheptanová kyselina

PFHxA - perfluorhexanová kyselina

PFNA - perfluornonanová kyselina

PFOA - perfluoroktanová kyselina

PFOS - perfluoroktansulfonát

PFUnA - perfluorundekanová kyselina

PTFE – polytetrafluorethylenu

$r$  - relativní produkt rozlišení

$R$  - molární plynová konstanta [ $8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]

$R_{j,k}$  - rozlišení

$R_x$  - rozpětí

SCAN - detekce iontu ve zvoleném intervalu hodnot

SEI - semi-ionizace nárazem elektronů

SPME - mikroextrakce na tuhé fázi

$s_r$  - relativní směrodatná odchylka [%]

$t$  - čas [min]

$T$  - teplota [K]

$t_M$  - mrtvý čas mobilní fáze [min]

$t_R$  - retenční čas [min]

$t_R'$  - redukovaný retenční čas [min]

TRI - termodynamický retenční index

$w$  - šířka píku při základně [min]

$w'$  - šířka píku v polovině výšky [min]

$\tilde{x}$  - medián

$\beta$  - fázový poměr

$\Delta H_v$  - molární výparná entalpie [ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]

$\Delta S_v$  - molární výparná entropie [ $\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]

## 7 Použitá literatura

- [1] Hekster, F. M.; de Voogt, P.  
Environmental and toxicity effects of perfluoroalkylated substance  
*Reviews of Environmental Contamination and Toxikology*, **179**, 99-121(2003)
- [2] de Voogt, P.; Sáez, M.  
Analytical chemistry of perfluoralkylated substance  
*Trends in Analytical Chemistry*, **25**, 326-342 (2006)
- [3] Washington, J. W; Henderson, W. M.; Ellington, J. J.; Jenkins, T. M  
Analysis of perfluorinated carboxylic acids in soils II: Optimization of chromatography and extraction  
*Journal of Chromatography A*, **1181**, 21–32 (2008)
- [4] Houde, M.; Martin, J. W.; Letcher, R. J.; Salomon, K. R.; Muir, D. C. G.  
Biological Monitoring of Polyfluoroalkyl Substance: A Review  
*Environmental Science & Technology*, **40**, 3463-3473 (2006)
- [5] Scott, F.  
Another fast-food fear  
*Environmental health perspectives*, **16**, 111 (2003)
- [6] Hájková, K.; Tomaniová, M.; Hajšlová, J.  
Perfluorované perzistentní kontaminanty v potravních řetězcích  
Dostupné z URL: <<http://www.phytosanitary.org/projekty/2004/vvf-10-04.pdf>>  
[cit. 23.4.2010]
- [7] Wu, F.; Gabryelski, W.; Froese, K.  
Improved gas chromatography methods for micro-volume analysis of haloacetic acids in water and biological matrices  
*Analyst*, **127**, 1318-1323 (2002)

- [8] Alzaga, R.; Salgado-Pentinal, C.; Jover, E.; Bayona, J. M.  
Development of procedure for the determination of perfluorocarboxylic acids in  
sediments by pressurised fluid extraction, headspace solid-phase microextraction  
followed by gas chromatographic mass spectrometric determination  
*Journal of Chromatography A*, **1083**, 1-6 (2005)
- [9] Hušek, P.  
Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents  
*Journal of Chromatography B*, **717**, 57-91 (1998)
- [10] Hušek, P.; Šimek, P.; Matucha, P.  
Smooth Esterification of Di- and Tricarboxylic Acids with Methyl and Ethyl  
Chloroformates in Gas Chromatographic Profiling of Urinary Acidic Metabolites  
*Chromatographia*, **58**, 623-630 (2003)
- [11] Dufková, V.; Čabala, R.; Karasová, D.; Štícha, M.  
A fast derivatization procedure for gas chromatographic analysis of  
perfluorinated organic acids  
*Journal of Chromatography A*, **1216**, 8659–8664 (2009)
- [12] Štulík, K. a kol.  
*Analytické separační metody*  
Praha, Nakladatelství Karolinum (2004)
- [13] Churáček, J.  
*Analytická separace látek*  
Praha, Státní nakladatelství technické literatury (1990)
- [14] González-Barreiro, C.; Martínez-Carballo, E.; Sitka, A.  
Method optimization for determination of selected perfluorinated alkylated  
substances in water samples  
*Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **386**, 2123–2132 (2006)

- [15] Zarzycki, P.K.; Wierzbowska, M.; Lamparczyk, H.  
The influence of temperature on the multiple separation of estrogenic steroids using mobile phases modified with  $\beta$ -cyclodextrin in high-performance liquid chromatography  
*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **15**, 1281–1287 (1997)
- [16] Drouen, A. C. J. H.; Billiet, H. A. H.; Schoenmakers, P. J.; de Galan, L.  
An improved optimization procedure for the selection of mixed mobile phases in reversed phase liquid chromatography  
*Chromatographia*, **16**, 48–52 (1982)
- [17] Curvers, J.; Rijks, J.; Cramers, C.; Knauss, K.; Larson, P.  
Temperature programmed retention indexes: calculation from isothermal data.  
Part 1: Theory  
*Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communications*, **8**, 607–610 (1985)
- [18] Sippola, E.; David, F.; Sandra, P.  
Temperature program optimization by computer simulation for the capillary GC analysis of fatty acid methyl esters on biscyanopropyl siloxane phases  
*Journal of High Resolution Chromatography*, **16**, 95–100 (1993)
- [19] Dose, E. V.  
Off-line optimization of gas chromatographic temperature programs  
*Analytical Chemistry*, **59**, 2420–2423 (1987)
- [20] Samuel, C.; Davis, J. M.  
Application of statistical-overlap theory to gas chromatograms simulated on nonpolar stationary phases with commercial software  
*Journal of Chromatography A*, **842**, 65–77 (1999)

- [21] Pichler, H.; Gans, O.; Krska, R.; Grasserbauer, M.  
Improvement of GC-MS analysis of organochlorine pesticides in sediments by  
use of a computer-optimized temperature program  
*Fresenius' journal of analytical chemistry*, **359**, 293–297 (1997)
- [22] Hinshaw, J. V.  
Strategies for GC Optimization, Part III — Software  
*LCGC*, **18**, 1040–1047 (2000)